

Glutamate metabolism and supplementation in COPD

Citation for published version (APA):

Rutten, E. P. A. (2006). *Glutamate metabolism and supplementation in COPD*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University Prss. <https://doi.org/10.26481/dis.20060915er>

Document status and date:

Published: 01/01/2006

DOI:

[10.26481/dis.20060915er](https://doi.org/10.26481/dis.20060915er)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is primarily a chronic disease that affects the respiratory system. Generally, two subtypes of COPD are described: emphysema and chronic bronchitis. Typical symptoms of COPD are shortness of breath, first only during exercise, in later stages also at rest and exercise intolerance. Apart from local impairment, systemic features like loss of fat-free mass (FFM), and muscle weakness are commonly present in COPD patients. The decrease in FFM can even be masked by a normal body weight. Due to the fact that FFM reflects the amount of metabolic active and contracting (skeletal muscle) tissue, FFM depletion is associated with skeletal muscle wasting, exercise intolerance, impaired health status and decreased survival.

The cause of skeletal muscle wasting is not yet totally clear. Skeletal muscle is build up of proteins, which consist of amino acids. A decrease of skeletal muscle mass only occurs when protein breakdown exceeds protein synthesis. Recent papers indeed showed disturbances in protein and amino acid metabolism in COPD patients. Furthermore, there is consistent evidence that the skeletal muscle concentration of the amino acid glutamate is reduced in COPD patients compared to age-matched healthy subjects. The reduced muscle glutamate concentration was associated with a decreased muscle glutathione concentration and with early anaerobiosis during exercise. As glutamate plays a central role in many metabolic pathways in the skeletal muscles at rest and during exercise, the decreased muscle glutamate concentration in COPD can contribute to functional impairment. We hypothesized that normalization of the skeletal muscle glutamate concentration can improve physical functioning and therefore be of benefit for COPD patients.

The aim of the studies in the present thesis was to investigate alterations in protein and amino acid metabolism in COPD patients with special emphasis for the amino acid glutamate. Protein and amino acid metabolism was investigated using the primed constant and continuous infusion protocol of stable isotopes both in the postabsorptive state and during feeding. In addition to measurements on whole-body level, we measured interorgan protein metabolism and obtained insight in the

metabolic response to feeding in different body compartments [ie splanchnic area and endogenous (muscle) compartment]. Moreover, we studied the metabolic and functional effects of glutamate supplementation in COPD patients.

The following section summarizes the main results of the experiment described in this thesis.

Using stable isotopes of the amino acids phenylalanine and 3-methylhistidine, we were able to measure the rate of whole-body and myofibrillar protein breakdown, respectively in two subgroups of COPD patients (cachectic and non-cachectic patients) and an age-matched healthy control group. Cachexia is characterized by a decreased body weight due to both a reduction of fat-free mass and fat mass. 3-methylhistidine is solely present in myofibrillar protein, and proteolysis of myofibrils releases 3-methylhistidine that cannot be reutilized. Therefore, the appearance of 3-methylhistidine in plasma can be used as a valid method to measure myofibrillar protein breakdown. As myofibrillar protein is mainly present in skeletal muscle, myofibrillar protein breakdown can be used as a marker for skeletal muscle protein breakdown. We found no differences in whole-body protein breakdown between the 3 groups. Myofibrillar protein breakdown however was increased in the cachectic COPD group compared to the non-cachectic group and the healthy control group. Furthermore, the increased myofibrillar protein breakdown was associated with a decreased plasma glutamate concentration, suggesting that the increased myofibrillar protein breakdown in cachectic COPD patients is related to alterations in glutamate metabolism. In a group of normal-weight COPD patients, we investigated the effect of protein feeding on whole-body protein metabolism and splanchnic amino acid extraction. Splanchnic amino acid extraction can be measured using the dual tracer technique where a stable isotope of phenylalanine was simultaneously intravenously and enterally administrated. COPD patients had a lower splanchnic extraction of phenylalanine compared to the healthy control subjects, subsequently leading to a higher anabolic response to feeding in this group. We concluded that the higher anabolic response to feeding in the normal-weight COPD group can be an adaptive mechanism to prevent or delay loss of body weight and skeletal muscle mass.

Next, we focused on the metabolism of the amino acid glutamate in COPD patients. Until now, glutamate metabolism was only measured in young subjects. However, COPD patients are in general older than 50 years. To detect possible age-related effects on glutamate metabolism, we compared the COPD group with an age-matched healthy control group and a young healthy control group. Glutamate production and splanchnic glutamate extraction were measured using a stable isotope of glutamate in the three study groups in the postabsorptive state and during feeding. Postabsorptive glutamate production and splanchnic glutamate extraction were not different between the COPD patients and age-matched healthy control subjects, but were lower in the healthy elderly compared to the healthy young. During feeding, splanchnic glutamate extraction increased in the healthy elderly, but remained unchanged in the COPD patients. These findings indicate that alterations in glutamate metabolism in COPD in the postabsorptive state are age-related. However, the results during feeding suggest that glutamate in food has more impact in the healthy elderly than in the young, and that COPD patients are more dependent on glutamate in food than the healthy elderly. From the findings mentioned above, we can conclude that protein and glutamate metabolism alters during ageing and COPD. It is of importance to gain knowledge about the metabolic alterations in COPD patients to receive insight if the patients' condition can be improved by a food supplement enriched with glutamate or other amino acids.

Based on the present findings and the earlier results of decreased skeletal muscle glutamate concentrations in COPD patients, we intended to positively modulate metabolism of COPD patients with supplementation of glutamate. To measure protein and amino acid metabolism during glutamate ingestion, we first developed a glutamate ingestion protocol to increase plasma glutamate concentration significantly to a new steady state level. Based on the data from several pilot studies, we concluded that continuous ingestion of 30 mg of glutamate per kg body weight every 20 min for 80 min increased systemic plasma glutamate levels in both the healthy elderly and the COPD patients indicating an increased glutamate availability to the periphery in both groups. Glutamate is closely linked to the amino acid glutamine that is often used as a supplement to increase the immune function

in surgery patients. We compared the metabolic effects of glutamate ingestion with those of glutamine ingestion in a group of stable COPD patients and age-matched healthy control subjects. In both groups, glutamate ingestion increased plasma ornithine concentration and decreased plasma citrulline concentration, whereas glutamine ingestion increased plasma concentration of citrulline and arginine, both amino acids related to the intestine and the liver. The observed results are thus glutamate specific and therefore glutamate supplementation cannot be replaced by glutamine supplementation. Subsequently, we investigated the metabolic and functional effects of repeated glutamate ingestion in rest and during exercise. Using muscle biopsies, we tested if the ingested glutamate increased skeletal muscle glutamate concentration and glutamate related metabolic parameters at rest and during submaximal ergometry. Muscle biopsies were taken from the lateral part of the quadriceps femoris by using the needle-biopsy technique after administration of local anesthetic while the subjects were in supine position. Glutamate ingestion did not increase skeletal muscle glutamate concentration or glutamate-related metabolic parameters like muscle glutathione concentration and plasma lactate concentration. In addition, we couldn't detect an effect of glutamate ingestion on functional parameters like muscle quadriceps strength and cycle endurance time. It is possible that other metabolic pathways than measured in the present research are affected by glutamate ingestion, or that glutamate supplementation to a complete meal has different effects. Future research is necessary to study the other potential effects of glutamate supplementation.

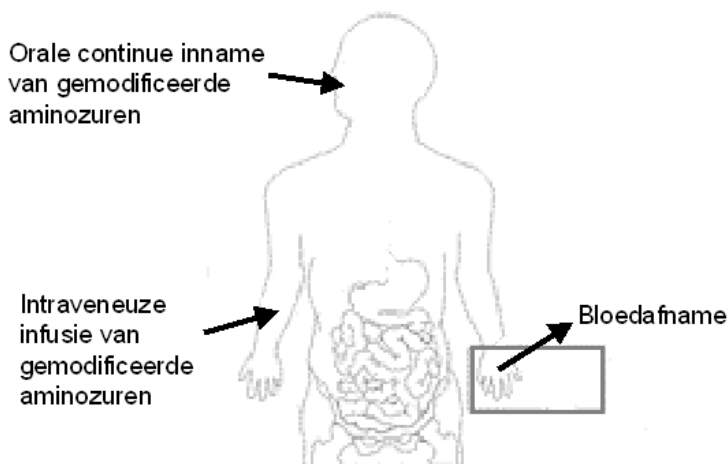
Samenvatting voor niet-ingewijden

Chronisch obstructief longlijden, of ook COPD genoemd, is een chronische longaandoening die gekenmerkt wordt door een progressieve vernauwing van de luchtwegen. COPD is een verzamelnaam voor emfyseem en chronische bronchitis. De patiënten vertonen een versnelde kortademigheid, eerst tijdens inspanning, maar later ook in rust. Uitgezonderd van een longtransplantatie, bestaat er nog steeds geen genezende therapie voor COPD, slechts een behandeling van de symptomen. De ziekte tast niet alleen de longen aan maar heeft een weerslag op het hele lichaam. Patiënten met COPD in een verder gevorderd stadium van de ziekte worden vaak gekenmerkt door gewichtsverlies waarbij zowel de spieromvang als de vetmassa vermindert. Afname van spiermassa in COPD is een proces dat zich over jaren ontwikkelt en dat onopgemerkt kan plaatsvinden wanneer er geen sprake is van gewichtsverlies. Spiermassaverlies draagt in belangrijke mate bij tot mobiliteitsverlies van de patiënt en de daarmee gepaard gaande vermindering van de levenskwaliteit.

De exacte oorzaak van het spiermassaverlies in COPD is nog niet helemaal duidelijk. Aangezien spierweefsel is opgebouwd uit eiwitten die op hun beurt uit aminozuren bestaan, treedt spieraafbraak enkel op als de eiwitopbouw lager is dan de eiwitaafbraak. Verstoringen in het eiwit- of aminozuurmetabolisme van COPD patiënten kunnen dus bijdragen tot spieraafbraak. Voorgaande onderzoeken hebben aangetoond dat er inderdaad veranderingen aanwezig zijn in zowel het eiwit- als het aminozuurmetabolisme bij COPD patiënten. Een veel gerapporteerde bevinding is de verlaagde concentratie van het aminozuur glutamaat in de spieren van deze patiënten in vergelijking met gezonde personen. De verlaagde spierglutamaatconcentratie bij COPD was geassocieerd met een verminderde antioxidatieve capaciteit en een versnelde verzuring tijdens inspanning. Aangezien glutamaat een centrale rol speelt in veel verschillende processen in de spier, kan de verlaagde glutamaatconcentratie bij COPD bijdragen tot mobiliteitsverlies van deze patiënten en normalisatie van deze concentratie in de spier kan een functionele verbetering bij COPD patiënten bewerkstelligen.

De onderzoeken beschreven in dit proefschrift hadden als doel om de verstoringen in het eiwit- en aminozuurmetabolisme bij COPD patiënten beter in kaart te brengen met speciale aandacht voor het aminozuur glutamaat. We hebben het eiwit- en aminozuurmetabolisme zowel in nuchtere als in gevoede toestand bestudeerd aangezien een persoon in het dagelijkse leven meer in gevoede dan in nuchtere toestand verkeert. Naast metingen op heel lichaamsniveau hebben we tevens een onderscheid gemaakt tussen het metabolisme in darm en lever, en het metabolisme in de spier. Tevens hebben we de effecten van glutamaatsupplementatie op het metabolisme en de spierfunctie van COPD patiënten onderzocht.

Welke methoden hebben we gebruikt in deze onderzoeken om bovenstaande doelen te bereiken? Het eiwit- en aminozuurmetabolisme hebben we onderzocht met behulp van aminozuren waar stabiele isotopen van waterstof (H_2), koolstof (C^{13}) of stikstof (N^{15}) zijn ingebouwd. Deze gemodificeerde aminozuren zijn volkomen onschadelijk en kunnen in het lichaam geïnfundeerd worden via een infuus in de ader (intraveneus, **figuur 1**) en/of via inname van een drankje (oraal). Deze gemodificeerde aminozuren betreffen specifieke aminozuren die van nature in lichaamseiwit voorkomen, maar omdat hun massa verzwaard is, kunnen ze onderscheiden worden van de 'natuurlijk veel voorkomende aminozuren'. De eiwitafbraak wordt gemeten aan de hand van de verschijningsnelheid van aminozuren omdat, tijdens infusie van de 'verzwaarde aminozuren', de ratio tussen de verzwaarde en natuurlijke aminozuren de snelheid van eiwitafbraak weergeeft. Als deze uitkomstparameters in het bloed gemeten worden, is het een algemene maat voor de eiwitafbraak en niet specifiek voor de spierafbraak, want de eiwitafbraak van andere delen van het lichaam (bv darm, lever, huid) wordt dan ook weergegeven. Post-translationeel gemodificeerde aminozuren (histidine naar 3-methylhistidine) die vrijkomen tijdens de afbraak van spierweefsel worden gebruikt als maat voor spierafbraak. Indien de gemodificeerde aminozuren zowel intraveneus als oraal worden toegediend, kan de eiwitstofwisseling in de darm en lever gemeten worden.



Figuur 1: De met stabiele isotopen verzwaarde aminozuren kunnen zowel intraveneus als oraal toegediend worden. De concentratie van deze aminozuren wordt in het bloed gemeten.

Om de techniek met stabiele isotopen te kunnen toepassen, moet het metabolisme van het lichaam in een stabiele toestand zijn. In nuchtere toestand en in rust is dit geen probleem. Indien we echter het eiwitmetabolisme in de gevoede toestand willen meten, moet ervoor gezorgd worden dat het lichaam dan ook weer stabiel is. Dit is mogelijk met een continue inname; dit wil zeggen dat kleine porties voeding gedurende een langere tijd (± 2 uur) in een bepaald tijdsinterval (20 min) worden ingenomen zodat er een continue opname van de voeding in de darm plaatsvindt. Na een bepaalde tijd van inname is het lichaam stabiel in gevoede toestand en kunnen we het eiwitmetabolisme meten. De continue inname hebben we ook toegepast om de effecten van glutamaatsupplementatie te onderzoeken. Eerst hebben we in verschillende vooronderzoeken getest welke concentratie glutamaat en welk tijdsinterval noodzakelijk zijn om de gewenste glutamaatstijging in het bloed te verkrijgen. Onze conclusie was dat een inname van 30 mg glutamaat per kg lichaamsgewicht elke 20 minuten gedurende 80 minuten voor een verhoogd stabiel plateau in de plasma glutamaatconcentratie zorgt. Hierbij hebben we aangetoond dat glutamaatinname de beschikbaarheid van glutamaat voor de organen (bijvoorbeeld de spieren) doet stijgen.

De metabole effecten van glutamaatinname hebben we op verschillende niveaus gemeten. Enerzijds hebben we het effect van glutamaatinname op het eiwit- en aminozuurmetabolisme getest op heel lichaamsniveau door diverse

parameters in het bloed te meten. Anderzijds hebben we lokaal naar de effecten van glutamaatinname in de spier gekeken met behulp van een spierbiopt, dit wil zeggen dat er onder lokale verdoving een klein stukje spier uit het bovenbeen wordt weggenomen. Op deze manier kunnen we testen of het glutamaat dat we via een drankje toedienen daadwerkelijk een verhoging van de spierglutamaat tot gevolg heeft.

De volgende alinea beschrijft de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift.

Gebruik makend van een stabiel isotoop van het aminozuur 3-methylhistidine, hebben we de afbraaksnelheid van een eiwit dat voornamelijk in de spier voorkomt gemeten. Dit wordt de myofibrillaire eiwitafbraak genoemd. We hebben de myofibrillaire eiwitafbraak gemeten in 2 subgroepen van COPD patiënten (patiënten met en zonder cachexie) en in een gezonde leeftijdsgematchte controle groep. Cachexie wordt gekenmerkt door ondergewicht waarbij zowel de spiermassa als de vetmassa verminderd zijn. Op heel lichaamsniveau vonden we geen verschil in eiwitmetabolisme tussen de verschillende groepen. De myofibrillaire eiwitafbraak was bij cachectische COPD patiënten echter hoger dan bij de niet-cachectische COPD patiënten en de gezonde controle personen. De verhoogde myofibrillaire eiwitafbraak was geassocieerd met een verlaagde glutamaatconcentratie in het bloed. Deze bevinding impliceert dat de verhoogde myofibrillaire eiwitafbraak in cachectische COPD patiënten gepaard gaat met een verstoring in het glutamaatmetabolisme. In de pre-cachectische fase, dus bij COPD patiënten met een normaal stabiel gewicht hebben we het effect van voeding op het eiwitmetabolisme op heel lichaamsniveau en op de aminozuuropname in de darm en lever onderzocht. Deze COPD patiënten hadden een lagere aminozuuropname in de darm en lever tijdens voeding in vergelijking met gezonde personen, wat gepaard ging met een verhoogde eiwitopbouw. Hieruit kunnen we concluderen dat de stofwisseling in de darm en lever bij gewichtsstabiele COPD patiënten reeds veranderd is tijdens voeding. De hogere eiwitopbouw tijdens voeding in deze patiënten kan een adaptief mechanisme zijn om gewichtsafname en spiermassaverlies uit te stellen of te vertragen.

Vervolgens hebben we onze aandacht gericht op het metabolisme van het aminozuur glutamaat bij COPD patiënten. Tot nu toe was het glutamaatmetabolisme namelijk uitsluitend onderzocht bij jongeren, maar COPD patiënten zijn over het algemeen ouder dan 50 jaar. Leeftijd *an sich* gaat gepaard met metabole veranderingen. Om de effecten van veroudering op het glutamaatmetabolisme te onderzoeken, hebben we daarom de patiëntengroep niet alleen vergeleken met gezonde ouderen maar ook met een jongere controle groep. Door middel van glutamaat met daarin een stabiel isotoop ingebouwd hebben we de glutamaatproductie in het lichaam en de opname van glutamaat in de darm en lever gemeten bij deze 3 groepen zowel in nuchtere als gevoede toestand. In de nuchtere toestand hebben we geen verschil kunnen aantonen in glutamaatstofwisseling tussen gezonde ouderen en COPD patiënten. Wel vonden we een leeftijdsgerelateerd verschil. Er was een verlaagde glutamaatproductie in het lichaam en een verminderde opname van glutamaat in de darm en lever bij gezonde ouderen in vergelijking met de jongeren. Tijdens voeding stijgt de glutamaatopname in de darm en lever bij gezonde ouderen, terwijl deze gelijk blijft in de COPD groep. Hieruit blijkt dat de veranderingen in het glutamaatmetabolisme in nuchtere toestand leeftijdsspecifiek zijn. De bevindingen tijdens voeding impliceren dat glutamaat in voeding meer invloed heeft bij ouderen dan bij jongeren en mogelijk zelfs COPD patiënten nog meer afhankelijk van glutamaat in de voeding. Uit bovenstaande bevindingen kunnen we samenvatten dat het eiwit- en aminozuurmetabolisme zowel verandert tijdens veroudering als bij COPD. Het in kaart brengen van de veranderingen in het metabolisme is van belang om inzicht te krijgen in hoeverre de conditie van de patiënt verbeterd kan worden door middel van het geven van voedingssupplementen die verrijkt zijn met glutamaat of andere aminozuren.

Op basis van bovenstaande resultaten en eerder onderzoek, hebben we in het tweede deel van dit proefschrift getracht het metabolisme van COPD patiënten positief te beïnvloeden met behulp van glutamaatsupplementatie volgens het eerder beschreven protocol van glutamaatinname. Glutamaat is zeer verwant aan het aminozuur glutamine dat bij patiënten vaak wordt gegeven als supplement om het immuunsysteem te verhogen rondom een operatieve ingreep. We hebben de

metabole effecten van beide aminozuren vergeleken in stabiele COPD patiënten en gezonde controle personen. Beide groepen reageerden hetzelfde op het supplement, maar er waren wel verschillende metabole reacties tussen de aminozuren. Glutamaatinname resulteerde nl. in een daling van de plasma citrullineconcentratie en een stijging van de plasma ornithineconcentratie, terwijl glutamineinname de plasma concentraties van citrulline en arginine (aminozuren die gelinkt zijn aan het metabolisme in de darm of de lever) deed stijgen. De waargenomen effecten zijn dus specifiek voor glutamaat en daarom kan supplementatie van glutamaat niet vervangen worden door glutaminesupplementatie. Vervolgens hebben we metabole en functionele effecten van glutamaatinname in rust en tijdens inspanning onderzocht. Met behulp van spierbiopten hebben we gemeten of het glutamaat dat gedronken werd de spierglutamaatconcentratie doet stijgen. Het bleek echter dat glutamaatinname zowel de glutamaatconcentratie als de concentratie van glutamaat-gerelateerde stoffen in de spier niet deed stijgen. Tevens konden we ook geen effect van glutamaatinname op functionele parameters zoals het uithoudingsvermogen en de spierversmoeidheid na een fietstest aantonen. Het is mogelijk dat andere processen dan deze die wij hebben onderzocht gemoduleerd worden door glutamaatinname, of dat glutamaatinname in combinatie met voeding een ander effect heeft. Toekomstig onderzoek zal hierin duidelijkheid dienen te brengen.

Concluderend kunnen we samenvatten dat zowel veroudering als COPD het eiwit- en aminozuurmetabolisme veranderen. Toekomstig onderzoek moet echter nog uitwijzen welke van deze veranderingen een fysiologische of een pathofysiologische rol spelen en wat de indicaties en mogelijkheden zijn voor aminozuursupplementatie.